

**REMARKS**

Applicants thank the Examiner for the very thorough consideration given the present application. Claims 11-15 and 20-25 are currently pending in this application. Claims 1-10 and 16-19 have been cancelled. No new matter has been added by way of the present amendment. For instance, the amendment to claim 11, as well as new claims 20-21 are supported by the Specification at, for example, par. [0057]. New claim 22 is supported by, for example, par. [0077]. New claim 23 finds support at par. [0060]. Similarly, new claim 24 finds support at, for example, paragraphs [0030] and [0055]. New claim 25 is supported by the Specification at [0023]-[0031]. Accordingly, no new matter has been added.

In view of the amendments and remarks herein, Applicants respectfully request that the Examiner withdraw all outstanding rejections and allow the currently pending claims.

**Information Disclosure Statement**

The Examiner notes that copies of non-patent literature documents by Nishikawa et al. and Nishi et al. were not received with the IDS of May 25, 2006.

Enclosed herewith are copies of these documents for the Examiner's consideration.

**Issues Under 35 U.S.C. 102(b)**

Claims 11-15 stand rejected under 35 U.S.C. 102(b) as being anticipated by JP 2002-347107 (hereinafter JP '107). Applicants respectfully traverse.

The Examiner asserts that JP '107 discloses a Petri dish comprising glass and a film, wherein the film includes a chloroform solution and has a porous structure formed at least on its

surface. The Examiner further asserts that the Petri dish of JP '107 is equivalent to the presently claimed "medical instrument", the glass is equivalent to the present "medical instrument substrate" and the film comprising a chloroform solution is equivalent to the claimed "resin."

Applicants respectfully submit that the Examiner has failed to establish a *prima facie* case of anticipation. For anticipation under 35 U.S.C. §102, the reference must teach each and every aspect of the claimed invention either explicitly or impliedly. Any feature not directly taught must be inherently present.

The present invention is directed, *inter alia*, to a medical instrument comprising a medical instrument substrate selected from the group consisting of a stent, a catheter and a medical tube, and further comprising a film including a resin and having a porous structure formed at least on its surface, wherein the surface of the medical instrument substrate is entirely or partially covered with the film (see, e.g., claim 11). In the present invention, the medical instrument substrate is covered with a cell growth inhibiting film (see, e.g., claim 25). The digestive system stent secures a digestive system tubular cavity in the body, and allows a digestive fluid and digestive enzymes contained therein to pass through, but blocks cancer cells (see, e.g., claims 21 and 25).

In contrast, JP '107 merely discloses a Petri dish comprising a glass substrate and an oriented film from a "honeycomb structure object", wherein the film is installed on the glass substrate. However, JP '107 does not explicitly or implicitly disclose a medical instrument as claimed, comprising a medical instrument substrate selected from the group consisting of a stent, a catheter and a medical tube.

Clearly, JP '107 fails to explicitly or implicitly teach each and every aspect of the claimed invention. Accordingly, reconsideration and withdrawal of this rejection are respectfully requested.

**Conclusion**


All of the stated grounds of rejection have been properly traversed, accommodated, or rendered moot. Applicants therefore respectfully request that the Examiner reconsider all presently outstanding rejections and objections and that they be withdrawn. It is believed that a full and complete response has been made to the outstanding Office Action and, as such, the present application is in condition for allowance.

Should there be any outstanding matters that need to be resolved in the present application, the Examiner is respectfully requested to contact Vanessa Perez-Ramos, Reg. No. 61,158 at the telephone number of the undersigned below, to conduct an interview in an effort to expedite prosecution in connection with the present application.

If necessary, the Commissioner is hereby authorized in this, concurrent, and future replies to charge payment or credit any overpayment to Deposit Account No. 02-2448 for any additional fees required under 37.C.F.R. §§1.16 or 1.17; particularly, extension of time fees.

Dated: *June 4, 2009*

Respectfully submitted,

By  #41575  
Marc S. Weiner *for*  
Registration No.: 32,181  
BIRCH, STEWART, KOLASCH & BIRCH, LLP  
8110 Gatehouse Road  
Suite 100 East  
P.O. Box 747  
Falls Church, Virginia 22040-0747  
(703) 205-8000  
Attorney for Applicant

Enclosures: Copies of non-patent literature documents by Nishikawa et al. and Nishi et al.

# MATERIALS SCIENCE & ENGINEERING

## C

Biomimetic and  
Supramolecular Systems  
(Incorporating Supramolecular Science)

Volume C10 (1999)

### Editors

P. Calvert (*Tucson, AZ, USA*)  
D. De Rossi (*Pisa, Italy*)  
T. Tateishi (*Ibaraki, Japan*)  
M. Petty (*Durham, UK*)

### Associate Editors

I. Aksay (*Princeton, NJ, USA*)  
G. Casolino (*Genova, Italy*)  
L. Chen (*Research Triangle Park, NC, USA*)  
H. Cruse (*Bielefeld, Germany*)  
F. Hedberg (*Washington, DC, USA*)  
I.W. Hunter (*Montreal, Que., Canada*)  
H. Komatsu (*Saitama, Japan*)  
R. Lang (*Tsukuba, Japan*)  
B. Lundström (*Linköping, Sweden*)  
G. McVay (*Richland, WA, USA*)  
S. Mann (*Bath, UK*)  
J.E. Mark (*Cincinnati, OH, USA*)  
T. Matsuda (*Osaka, Japan*)  
T. Motokawa (*Tokyo, Japan*)  
F. Oosawa (*Tokyo, Japan*)  
K. Persaud (*Manchester, UK*)  
C.A. Rogers (*Columbia, SC, USA*)  
Y. Sakurai (*Tokyo, Japan*)  
T. Seki (*Yokohama, Japan*)  
S. Shankar Sastry (*Berkeley, CA, USA*)  
D. Tirrell (*Amherst, MA, USA*)  
T. Tsuruta (*Tokyo, Japan*)  
J.F.V. Vincent (*Reading, UK*)



ELSEVIER

AMSTERDAM-LAUSANNE-NEW YORK-OXFORD-SHANNON-TOKYO

**Abstracting and/or Indexing Services**

This journal is cited by the following Abstracting Services: Cambridge Scientific Abstracts; Chemical Engineering and Biotechnology Abstracts (online database); Current Biotechnology Abstracts; Engineered Materials Abstracts; Engineering Index; Fluid Abstracts; Fluidex; FIZ Karlsruhe; Glass Technology Abstracts; INSPEC Information Services; Metals Abstracts; Phys Database; Physics and Chemistry of Glasses; Surface Treatment Technology Abstracts.

International Standard Serial Number 0928-4931

© 1999 Elsevier Science B.V. All rights reserved.

This journal and the individual contributions contained in it are protected under copyright by Elsevier Science B.V., and the following terms and conditions apply to their use:

**Photocopying**

Single photocopies of single articles may be made for personal use as allowed by national copyright laws. Permission of the publisher and payment of a fee is required for all other photocopying, including multiple or systematic copying, copying for advertising or promotional purposes, resale, and all forms of document delivery. Special rates are available for educational institutions that wish to make photocopies for non-profit educational classroom use.

Permissions may be sought directly from Elsevier Science Rights & Permissions Department, PO Box 800, Oxford OX5 1DX, UK; Tel.: +44-1865-843830; Fax: +44-1865-853333; E-mail: [permissions@elsevier.co.uk](mailto:permissions@elsevier.co.uk). You may also contact Rights & Permissions directly through Elsevier's home page (<http://www.elsevier.nl>), selecting first 'Customer Support', then 'General Information', then 'Permissions Query Form'.

In the USA, users may clear permissions and make payments through the Copyright Clearance Center, Inc., 222 Rosewood Drive, Danvers, MA 01923, USA; Tel.: +1-978-7508400; Fax: +1-978-7504744, and in the UK through the Copyright Licensing Agency Rapid Clearance Service (CLARCS), 90 Tottenham Court Road, London W1P 0LP, UK; Tel.: +44-171-6315555; Fax: +44-171-6315500. Other countries may have a local reprographic rights agency for payments.

**Derivative Works**

Subscribers may reproduce tables of contents or prepare lists of articles including abstracts for internal circulation within their institutions. Permission of the publisher is required for resale or distribution outside the institution.

Permission of the publisher is required for all other derivative works, including compilations and translations.

**Electronic Storage or Usage**

Permission of the publisher is required to store or use electronically any material contained in this journal, including any article or part of an article.

Except as outlined above, no part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system or transmitted in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording or otherwise, without prior written permission of the publisher.

Address permissions requests to: Elsevier Science Rights & Permissions Department, at the Mail, Fax and E-mail addresses noted above.

**Notice**

No responsibility is assumed by the Publisher for any injury and/or damage to persons or property as a matter of products liability, negligence or otherwise, or from any use or operation of any methods, products, instructions or ideas contained in the material herein. Because of rapid advances in the medical sciences, in particular, independent verification of diagnoses and drug dosages should be made.

Although all advertising material is expected to conform to ethical (medical) standards, inclusion in this publication does not constitute a guarantee or endorsement of the quality or value of such product or of the claims made of it by its manufacturer.

**USA mailing notice:** *Materials Science & Engineering C* (ISSN 0928-4931) is published bimonthly except in August and October by Elsevier Science B.V. (P.O. Box 211, 1000 AE Amsterdam, The Netherlands). Annual subscription price in the USA is US\$1386 (valid in North, Central and South America), including air speed delivery. Application to mail at periodical postage rate is pending at Jamaica, NY 11431.

**USA POSTMASTER:** Send address changes to *Materials Science & Engineering C*, Publications Expediting, Inc., 200 Meacham Ave, Elmont, NY 11003.

**AIRFREIGHT AND MAILING** in the USA by Publications Expediting Inc., 200 Meacham Avenue, Elmont, NY 11003.

Printed in The Netherlands

© The paper used in this publication meets the requirements of ANSI/NISO Z39.48-1992 (Permanence of Paper).



Materials Science and Engineering C 10 (1999) 141–146



www.elsevier.com/locate/msec

## Mesoscopic patterning of cell adhesive substrates as novel biofunctional interfaces

Takehiro Nishikawa <sup>a,\*</sup>, Jin Nishida <sup>a,b</sup>, Ryusuke Ookura <sup>a,b</sup>, Shin-Ichiro Nishimura <sup>b</sup>,  
Shigeo Wada <sup>a</sup>, Takeshi Karino <sup>a</sup>, Masatsugu Shimomura <sup>a</sup>

<sup>a</sup> Hokkaido University, Research Institute for Electronic Science, N12W6, Sapporo 060-0812, Japan

<sup>b</sup> Hokkaido University, Division of Biological Sciences, Graduate School of Science, N10W8, Sapporo 060, Japan

Accepted 21 May 1999

### Abstract

In this report, cell adhesion to honeycomb-patterned films is described with respect to the dimensions of the honeycomb structure. The honeycomb-patterned films can be fabricated by casting a dilute solution of amphiphilic polymers on solid substrates. The honeycomb structure is not homogeneous in all dimensions. Analysis of distribution of the honeycomb hole sizes demonstrates a gradual decrease in honeycomb hole diameter along the radius of the cast area. The largest holes were located near geometric center of the cast area. The diameter of the largest honeycomb holes in the cast area could be controlled by varying the cast volume of the polymer solution. Cell cultures on the honeycomb films demonstrated that cell adhesion could be inhibited at the outer region of the cast area. The extent of the inhibition of cell adhesion was influenced by the chemical properties of the polymers constituting the honeycomb films. © 1999 Elsevier Science S.A. All rights reserved.

**Keywords:** Honeycomb films; Dimensions of honeycomb structure; Cell adhesion

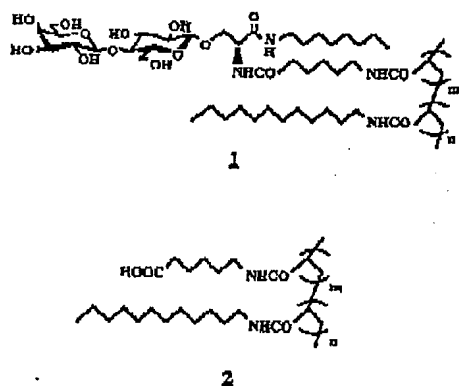
### 1. Introduction

It is well-known that cell behavior on material surfaces is significantly influenced by the chemical properties of the surfaces [1]. However, recently it has been indicated that the texture of the material surfaces also plays a crucial role in controlling cell behavior through morphologically regulated interactions between the substrates and the cells [2–4]. Therefore, microfabrication will be a key technology in providing novel interfacial functions on material surfaces. Photolithography has been the commonest and most successful technique in the fabrication of defined micron-scale textures. On the other hand non-photolithographic approaches have also been pursued eagerly and have been studied extensively in material science. Micro-contact printing [5] is in the front line of the non-photolithographic microfabrication methods. Recently, it was reported that the microtexture of material surfaces can be fabricated using the self-organization of polymers. Phase separation in thin films of block copolymers is a typical

example of a thermodynamically driven pattern formation [6]. The dewetting process of liquid polymer films can produce complicated patterns like the Voronoi cell pattern [7]. Polymer films having honeycomb structure were produced by evaporating a solution of star-shaped polystyrene [8]. Simultaneous and hierarchical formation of the microscopic structure (aggregate of molecules) and the mesoscopic alignment are intriguing features of the lithography-free fabrication process using the self-organization of polymers. The mesoscopic patterns formed by self-assembly of the polymers are also becoming increasingly important, because the technique is more cost-saving and technologically simpler than the lithographic techniques.

We have also found that two-dimensional mesoscopic patterns can be fabricated by casting dilute organic solutions of amphiphilic compounds on solid substrates [9–13]. The patterns are classified into three geometric features: honeycomb, ordered lines, and ordered dots, depending on the preparation conditions of the films. The honeycomb structures occur in a humid atmosphere. Recently, we reported that the honeycomb films work as cell culture substrates [14]. Cell adhesion to the cast films of am-

\* Corresponding author. Tel.: +81-11-706-3563; fax: +81-11-706-4974; E-mail: unishi@poly.es.hokudai.ac.jp



Scheme 1. Chemical structure of amphiphilic copolymers applied to the fabrication of honeycomb-patterned films.

phiphilic polymers is affected by the surface morphology (non-textured or honeycomb surface) or chemical properties of the polymer constituting the cast films. In this article, we describe the effect of the dimensions, especially

the diameter of the holes in the honeycomb films on the respective cell adhesion.

## 2. Experimental

### 2.1. Materials

Amphiphilic copolymers (1 and 2 in Scheme 1) used for the fabrication of honeycomb-patterned films were synthesized according to the procedure previously reported [15]. The water was purified by a Millipore system (Milli-Q, Millipore). Other organic and inorganic chemicals were commercially available and used without further purification.

### 2.2. Preparation of honeycomb films for cell culture substrates

Honeycomb-patterned films were prepared on cover glasses ( $\phi$ : 15 mm) (Matsunami Glass Industry, Japan). Twenty microliters of dilute solutions of amphiphilic compounds (solvent: benzene for polymer 1 and chloroform for polymer 2, concentration: 1.0 mg/ml) were cast onto a glass substrate in humid atmosphere (about 80% r.h. at  $21 \pm 1^\circ\text{C}$ ). The surface morphology of the cast films was

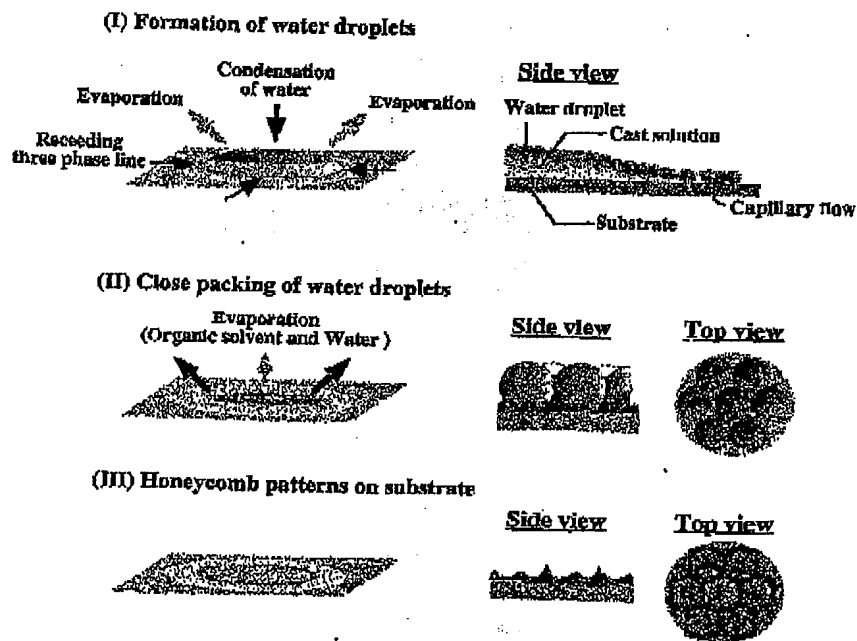


Fig. 1. Schematic representation of honeycomb film formation.



observed by using transmission optical microscopy (BMH2, Olympus) and atomic force microscopy in contact mode (NV2500, Olympus).

### 2.3. Measurement of the diameter of honeycomb holes

Two honeycomb films of polymer 1 were fabricated by casting 2 or 5  $\mu\text{l}$  of the polymer solution (1 mg/ml) on each glass substrate. The obtained honeycomb films of polymer 1 showed a disk-like shape with a diameter of 0.3 and 0.5 cm, respectively, on the substrates. Optical microscopy images with a size of  $40\text{ }\mu\text{m} \times 100\text{ }\mu\text{m}$  were taken in different regions on each film. The positions of the regions were located on the diameter of the cast area. The location of the images in respect to the diameter of the film was specified as follows;  $X = d_c/d_0$ , where  $d_0$  is the diameter of the film and  $d_c$  is the distance of the center of the image from the edge of the film (Fig. 2(a)). The observed positions were located at  $X = 0.025, 0.25, 0.45, 0.5, 0.55, 0.75$ , and  $0.975$  from the edge of each cast area. The number of honeycomb holes in a narrow strip ( $40\text{ }\mu\text{m} \times 10\text{ }\mu\text{m}$ ) was counted over the whole image ( $40\text{ }\mu\text{m} \times 100\text{ }\mu\text{m}$ ). The whole area of the image divided by the number of honeycomb holes included in the image provided the average area of a honeycomb hole. The average diameter of honeycomb holes was calculated using the average area of honeycomb holes.

### 2.4. Cell culture

Rovine aorta endothelial cells (ECs) were cultured on the honeycomb-patterned films. The glass plates on which the cast films were attached were placed at each well of the culture dish (24 wells). Suspensions of trypsinized ECs were seeded on the films ( $3.3 \times 10^3$  cells/well). The ECs were cultured in Iscove's modified Dulbecco's medium (Sigma BioScience, USA) which is supplemented with 20% fetal calf serum (Filtron, Australia) at  $37^\circ\text{C}$  in a humidified 5%  $\text{CO}_2$  atmosphere. ECs on the cast films were observed by using phase contrast microscope (Diaphot 300, Nikon) 24 h after cell seeding.

## 3. Results and discussion

### 3.1. Formation process of honeycomb structure

An overview of the formation process of the honeycomb films is described in this section for better understanding. The honeycomb films can be fabricated easily by casting dilute organic solutions of an amphiphilic polymer onto a solid substrate in a humid atmosphere. The dimensions of the honeycomb structures (hole diameter, line width, and wall height) can be passively controlled by the polymer concentration of cast solution and the humidity of the atmosphere [9–13]. However, the active control of the dimensions of the honeycomb structures is actually impos-

sible, because the film formation is closely related to the non-equilibrium processes of the condensation of water and the evaporation of the cast solution. Thus it is noteworthy that the honeycomb structure can be significantly influenced by the film formation process.

The formation processes are represented in Fig. 1 according to the previous reports (in situ observation of evaporating cast solution [9–13]). The two-dimensional assembly of water droplets on solid substrates is a key step in the honeycomb film formation. Right after casting the polymer solution tiny water droplets (diameter ca. 1–2  $\mu\text{m}$ ) cover the entire surface. (Fig. 1(D)) The droplets form

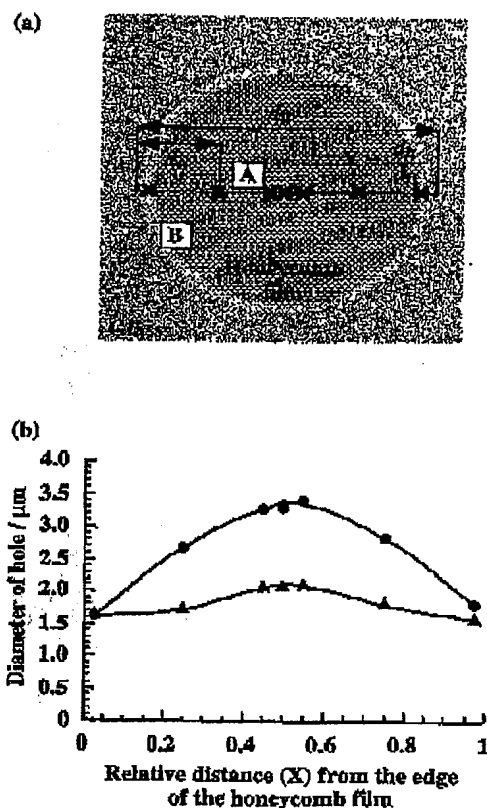


Fig. 2. (a) Schematic representation of the top view of the cast area. Average diameters of honeycomb holes were evaluated at the positions marked by crosses. Observation positions in which atomic force microscopic measurements (see Fig. 3) were performed were indicated by the sign "A" and "B". (b) Distribution of the honeycomb hole diameter along the diameter of the cast area. Closed circle: the distribution on the honeycomb film, which was prepared by casting 5  $\mu\text{l}$  of benzene solution of polymer 1. Closed triangle: the distribution on the honeycomb film, which was prepared by casting 2  $\mu\text{l}$  of benzene solution of polymer 1.

upon the condensation of water present in the atmosphere during the evaporation of the cast solution. The presence of amphiphilic polymers stabilizes the water droplets and prevents their fusion. These droplets are closely packed at the edge of the receding three phase line and form a single layer of water microspheres (Fig. 1(I) and (II)). It is considered that the capillary flow occurring at the three phase line assists the hexagonal self-assembling of the water droplets on the substrate. The layer of water droplets gradually covers the substrate from the outer region to the inner region of the cast area, as the cast solution evaporates. (Fig. 1(II)) The layer of water microspheres works as a template for the honeycomb structure. Small gaps between the water droplets filled with the aggregated polymer remain as honeycomb patterns on the substrate after the organic solvent and the water have disappeared (Fig. 1(III)). In Sections 3.2 and 3.3, we describe the size distribution of the honeycomb holes and the cell adhesion to the two selected regions of the honeycomb films, which exhibit different average hole diameters.

### 3.2. Diameter of honeycomb holes

According to the process of honeycomb film formation, the honeycomb structure in the inner region of the cast area forms later than that in the outer region of the cast area. The time lag in the formation of the honeycomb structure on the cast area means that water droplets in the

inner region of the cast area have more time to grow. Therefore, it is assumed that the average diameter of the honeycomb holes in the inner region of the cast area is relatively larger than that of the honeycomb holes in the outer region. This can be verified by analyzing the size distribution of the honeycomb holes.

In this case the average diameter of the honeycomb holes was evaluated on the honeycomb films of polymer 1, which were prepared by casting 2 and 5  $\mu\text{l}$  of the polymer solution. Fig. 2(b) shows the relation between the average diameter and the relative distance from the edge of the cast area to the observed position. The diameter of the honeycomb holes goes through a maximum at the center and gradually decreases towards the circumference of the cast area. (Fig. 2(h)) Two films prepared by casting different volumes (2 and 5  $\mu\text{l}$ ) of polymer solution have the same lower limit in hole size of 1.6  $\mu\text{m}$ . On the other hand, the maximum diameter increases from 1.9 to 3.8  $\mu\text{m}$  by increasing the cast volume from 2 to 10  $\mu\text{l}$ . The hole size of the honeycombs can be passively controlled by changing the cast volume of the polymer solution, the polymer concentration and the humidity of atmosphere.

### 3.3. Cell adhesion to the honeycomb films

In this section, the cell adhesion to the honeycomb films is described from the viewpoint of the effect of the honeycomb size. Assuming that the cells are attached only

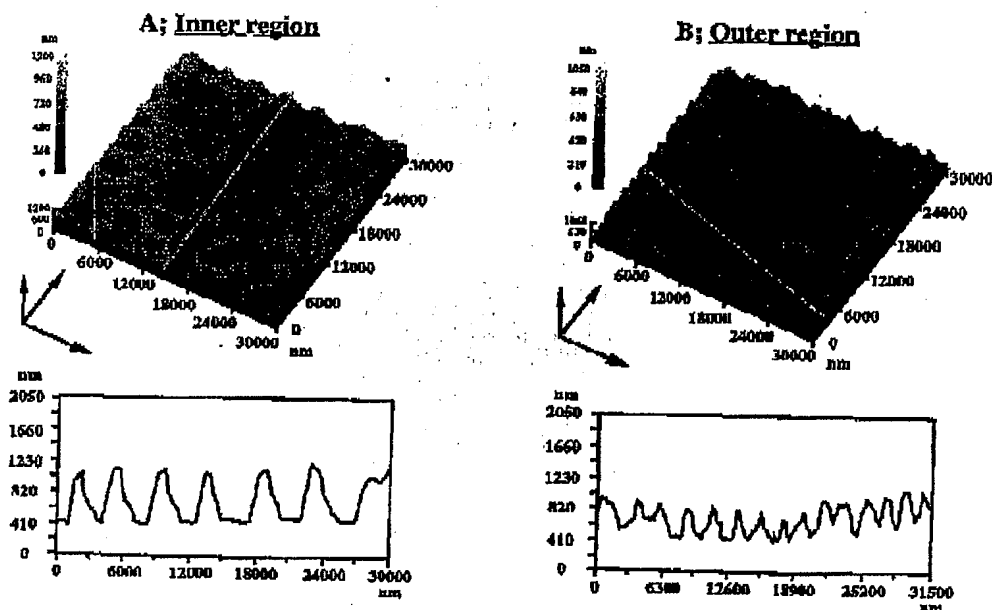


Fig. 3. Surface topographic images of honeycomb films of polymer 1 obtained by atomic force microscopy operated in contact mode. The cross-sectional profiles were taken along the line indicated in each topographic image.

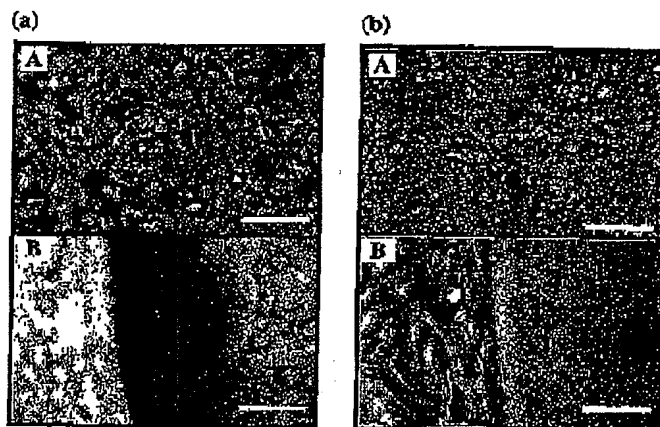


Fig. 4. Phase contrast microscopy images of cell culture on honeycomb films ((a) honeycomb film of polymer 1 and (b) honeycomb film of polymer 2). "A" and "B" in the images denote the observed positions on the honeycomb films (see Fig. 2(a)). The bars in each image represents 50  $\mu\text{m}$ .

to the honeycomb patterns, the diameter of the holes is an important factor in controlling the total area available for cell adhesion. Therefore, the honeycomb films which exhibit a wide distribution of hole diameters are useful for studying the relation between honeycomb structure and cell adhesion. Based on the result that the maximum hole diameter of honeycomb depends on the cast volume of polymer solution, the honeycomb films were prepared by casting 20  $\mu\text{l}$  of the dilute solutions of polymers 1 and 2. According to our previous report [14], the honeycomb films composed of polymers 1 or 2 can work as cell culture substrates. The cast area had a disk-like shape with a diameter of ca. 1 cm. The signs "A" and "B" in Fig. 2(a) indicate the positions where the topographic features of honeycomb films and the cell adhesion were studied.

The honeycomb film of polymer 1 had a distinct hole diameter size distribution. Fig. 3 shows the surface topographic images of the honeycomb film of polymer 1, which were measured at the inner (A) and outer (B) regions of the cast area. The average diameters, which were estimated from the images are 4.6  $\mu\text{m}$  at the inner region (A) and 2.0  $\mu\text{m}$  at the outer region (B), respectively. The cross-sectional profiles display 0.7 (A) and 0.4  $\mu\text{m}$  (B) of the average height of the honeycomb structure at these two regions. Similar structural features of the honeycomb holes could be found by topographic studies using AFM at the inner and outer region of the honeycomb film of polymer 2 (AFM image not shown). Dimensions of the honeycomb film of polymer 2: diameter of honeycomb hole, 3.8 (A) and 2.0  $\mu\text{m}$  (B) and height of honeycomb, 0.7 (A) and 0.5  $\mu\text{m}$  (B). These structural features of the honeycomb films indicate that the honeycomb films are adequate for studying the relation between the size of honeycomb holes and cell adhesion.

Differences in cell adhesion were observed for the inner and the outer region of honeycomb films of polymer 2. Fig. 4 shows phase-contrast microscopy images of the cell culture on the honeycomb films 24 h after seeding the cells. Bovine aorta ECs were attached to the whole region of the honeycomb film of polymer 1. (Fig. 4(a-A) and (a-B)) However, ECs were attached to the inner region (Fig. 4(b-A)), and not to the outer region (Fig. 4(b-B)) of the honeycomb film of polymer 2. The difference in the adhesiveness of the ECs observed at the two regions of the honeycomb films of polymer 2 gives an indication of the honeycomb-dimension thresholds (hole diameter, line width, and wall height), which determine the cell adhesion to the honeycomb films. Two micrometers of hole diameter would be one of the thresholds determining the cell adhesion to the honeycomb film of polymer 2. Moreover, the difference in the adhesiveness between the two honeycomb films composed of polymers 1 and 2 suggests that the thresholds can be influenced by chemical properties of the polymers constituting the honeycomb films. However, the present results of the cell culture experiment did not show the structural thresholds of the honeycomb film of polymer 1. Further studies are necessary for the elucidation of the relation between the honeycomb structure and cell adhesion.

#### 4. Conclusions

We have analyzed the size distribution of honeycomb holes and discussed the role they play on cell adhesion. Our overview of the honeycomb film formation process suggested that the size distribution is closely related to the time lapse process during the evaporation of the cast solution. The size distribution of honeycomb holes can

actually be measured along the diameter of the cast area. The honeycomb holes with larger diameters tend to be located at the inner region of the film. Though the precise control of the honeycomb structure is impossible, the maximum hole size of the honeycomb structure can be controlled by varying the cast volume. When using the honeycomb film of polymer 2 for cell culturing, cell adhesion was prevented on areas with less than 2  $\mu\text{m}$ . The inhibition of the cell adhesion suggests the existence of a threshold honeycomb hole size. The threshold seems to depend on the chemical properties of the polymer. Therefore, it is important to consider the dimensions of the honeycomb films as well as the chemical properties of the film surfaces.

#### References

- [1] J.A. Hubbel, *Bio/Technology* 13 (1995) 565.
- [2] C.S. Chen, M. Mitchen, S. Huang, G.M. Whitesides, D.E. Ingber, *Science* 276 (1997) 1425.
- [3] E.T. den Braber, J.R. de Ruijter, L.A. Gmel, A.F. von Recum, J.A. Jansen, *J. Biomed. Mater. Sci.* 40 (1998) 291.
- [4] S. Tanczer, L. Kam, M. Isaacson, H.G. Craighead, W. Shain, J. Turner, *J. Vac. Sci. Technol.* 15 (1997) 2848.
- [5] Y. Xia, G.M. Whitesides, *Angew. Chem. Int. Ed.* 37 (1998) 551.
- [6] G.J. Liu, Y.K. Ding, *Adv. Mater.* 10 (1998) 69.
- [7] G. Reiter, *Langmuir* 9 (1993) 1344.
- [8] G. Widowski, M. Kawiso, B. Francois, *Nature* 369 (1994) 387.
- [9] O. Karthaus, K. Ijro, M. Shimomura, *Chem. Lett.* (1996) 821.
- [10] N. Maruyama, T. Koito, T. Sawadaiishi, O. Karthaus, K. Ijro, N. Nishi, S. Tokura, S.-I. Nishimura, M. Shimomura, *Supramol. Sci.*, in press.
- [11] N. Maruyama, T. Koito, J. Nishida, T. Sawadaiishi, X. Clerod, K. Ijro, O. Karthaus, M. Shimomura, *Thin Solid Films* 327-329 (1998) A14.
- [12] O. Karthaus, L. Grisejs, N. Maruyama, M. Shimomura, *Thin Solid Films* 327-329 (1998) 839.
- [13] M. Shimomura, T. Koito, N. Maruyama, K. Azai, J. Nishida, L. Grisejs, O. Karthaus, *Mol. Cryst. Liq. Cryst.*, in press.
- [14] T. Nishikawa, J. Nishida, K. Ookura, S.-I. Nishimura, S. Wada, T. Karino, M. Shimomura, *Supramol. Sci.*, submitted for publication.
- [15] S.-I. Nishimura, K. Yamada, *J. Am. Chem. Soc.* 119 (1997) 10555.

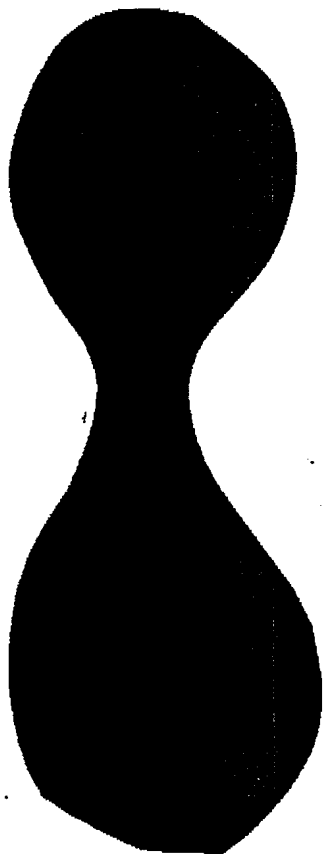
MAIN Ser CISTI/ICIST NRC/CNRC  
RD130 MAIN Ser  
J61 0300-0818  
v. 29 Received on: 07-19-2000  
no. 1 Jinko zoki = The Japanese  
2000 journal of artificial  
organs.

日本人工臓器学会  
Vol.29 No.1 2000  
ISSN 0300-0818

第29巻 第1号  
平成12年2月15日発行  
年5回発行

ial Organs

第37回 日本人工臓器学会大会論文集



JAPANESE  
SOCIETY FOR  
ARTIFICIAL  
ORGANS  
jkaō

## ●私の提言

## 必然性ということ

堀内 孝

(東亜大学大学院総合学術研究科, 工学部生命科学工学科)

産業革命以来200年近く経ち、物作りの作業はさまざまな分野で広がった。経済効果も重なり、近代科学は効率化が尊厳され、合理的な物づくりが基本的なコンセプトになった。ついこの間まで使用していた飯炊き釜がさまざまな制御機能を有する押しボタン式の自動炊飯器に変換したように、消費者の最低限の欲求が満足されると、それに装飾を施したり、利便性を付加する方向に進んだ。一般的な家電製品や自動車等の大量消費材はほぼ同じ過程を歩み、欲望を駆り立てられたわれわれは、ボタン1つの違いで製品を選び、生産者はボタン1つに固執した。人工臓器という物づくりでも同じことが言えるのであろうか。

今から約15年程前、米国オハイオ州クリーブランドにある人工臓器博物館を何度か訪ねる機会があった。人工臓器博物館は第2次世界大戦前には大邸宅が立ち並んでいたユークリッド通りに面していたが、その建物はえらく古めかしく、アメリカのB級ホラー映画に出てくるような趣があったことを記憶している。博物館と言うよりも言われぬ雰囲気と同調した、名前からして恐ろし気な人工臓器なるものの目の前にして、その本当の姿をじっくり見るに至らなかったことを今さらながら残念に思っている。そこには、人工物であるのに不思議に説得力のあるものが並び、迫力があつた。開発者の夢があつたか否かは定かではないが、何か必然的なものを感じたのは私だけであつたらうか。展示されている機器はその時代時代の英知が結集され、開発の意図が明確に見えていた。最低限の欲求が満たされた人工臓器が患者や使用者に使いやすい機器になってゆくことは当然であるが、ここで若干他の家電製品と異なるのは「必然性があるか」ということだと思っている。これは、別に製品の開発といった比較的わかりやすい例だけでなく、毎年行われる学会大会での発表や投稿論文の内容、さらには各委員会を始めとする諸々の学会活動も同じである。必然

性のある、動機のはっきりとした研究であれば、それは直ぐに製品化できなくとも、ネガティブのデータであっても、少々時間がかかり成果としての形のはっきりしないものであっても何らかの形で必ず次世代に残るものと考えられる。

ところで、会員費の無駄使いと批判されている急増の各種委員会(1992年では9委員会、現在では21委員会)の中に、必然性のある、動機のはっきりとした研究を育成する試みがようやく芽を出しつつあることも事実であり、明るい材料である。私見で大変恐縮ではあるが、JSAO-Grantの今年の選定はGrant期間完了時の成果が楽しみな興味ある内容を含むものが多くあり、応募側と選定側の必然的な出合いが感じられた。もう一つ、英文誌発刊も必然的な選択であり、日本人が英語で論文を執筆するという(必然性とは矛盾する)点を除けば無理のない方向性であつたように思える。ここら辺のことは、もう一度日本人の勤勉さに立ち返って是非とも乗り越えなくてはならない関所のような気がする。余計なことだが、英語に堪能になるよう切磋琢磨するという意味だけではない。簡単に越えられるハードルなど、昔も今もあるわけがなく、今が特別困難な時期ではないはずである。ただ、ひとつ異なるとしたら無駄を嫌い、効率的な生き方に慣れ過ぎてしまったわれわれが、われわれ以上に待つことに慣れていない次の世代の人々に、あのクリーブランドの博物館に展示されていた諸々の人工臓器の醸し出す必然性をどのように継承してゆくかである。人工臓器学会をここまで導いてこられた先輩達がされたように、社会に対する責任という必然的な使命がある限り、この作業は止まることはないと確信している。JSAO-Grantにせよ和文誌、英文誌にせよ人工臓器会員全員が当事者であり、今後の育成は全会員の双肩にかかっていると云っても過言ではないであらう。

## ●原著

人工臓器 29(1), 257-263 (2000)

## 高機能カバードステントの開発：微細加工化と薬物徐放機能

西 正吾, 中山泰秀\*, 植田初江\*\*, 石川正恒, 松田武久\*\*\*

慢性期に起こる再狭窄を抑制する目的で多孔質高分子フィルムのカバーを有する高機能ステントの開発を行った。カバー材として用いたセグメント化ポリウレタンフィルムをエキシマレーザー加工することにより、高精度で微細孔形成を行った。作製した多孔化フィルムを顕微鏡下にてバルーン拡張型ステントの外面に巻き縫合固定した後、フィルム断端を溶融接合することによりカバードステントを作製した。また、分子設計した光反応性ゼラチンをヘパリンと混合してフィルム表面に塗布した後に、光照射するとヘパリンを包埋したゼラチンゲルが形成され、フィルム表面に固定化できた。多孔化により経孔的な組織侵入が起こり新生内膜組織の再構築が促進されたこと、並びにヘパリン包埋（局所投与）により血液凝固が大幅に抑制されたことが動物移植実験により示された。

Nishi S, Nakayama Y, Ishibashi-Ueda H, Ishikawa M, Matsuda T Development of a Novel Highfunctional Covered Stent with Micropore and Drug Delivery Performance. To prevent chronic restenosis after angioplasty, we developed a multifunctional stent covered with microporous polymer film. Segmented polyurethane film as a cover material was precisely micropored by excimer laser microprocessing. The covered stent was prepared by wrapping a balloon expandable stent with microporous film and subsequently fixing it by suturing and then gluing. Following this, molecular-designed photoreactive gelatin with heparin was coated on the microporous film. Upon irradiation, the gelatin gel immobilized with heparin was formed and simultaneously fixed on the film surface. Animal experiments showed that reconstruction of neointimal tissue layer was enhanced by transmural tissue ingrowth through micropores, and that thrombus formation was significantly prevented by release of the immobilized heparin (local administration). Keywords: covered stent, micropore, drug delivery, segmented polyurethane, photoreactive gelatin

Jpn J Artif Organs 29(1), 257-263

## I. 緒 言

近年、動脈硬化による全身血管の狭窄・閉塞病変がますます増加する傾向にある。頭頸部の血管領域においては従来は血栓内腔剝離術や血管吻合などの血行再建術が盛んに行われてきた。しかし、心臓、末梢動脈系においてバルーンによる経皮的血管拡張術(PTCAまたはPTA)が行われ良好な成績を収めてきたことより、これまで脳塞栓症などの危ぐのために避けられてきた頭頸部領域においても適用されつつある。しかし、慢性期における再狭窄の発生などから治療法はバルーンPTAからステントへと変遷しつつあり、また更に新たな手段の模索が行われつつある。

本研究では従来のステントに対して再狭窄を防止する目的でエキシマレーザーを用いて緻密な孔設計を施した多孔質フィルムでカバーし、さらに急性期の血栓形成による閉

塞を予防するためにヘパリンなどの薬物担体機能を付与した高機能カバードステントの開発を行った。

## II. 方 法

## 1. カバードステントの作製

カバーフィルムの基材としてセグメント化ポリウレタンフィルム(シーダム社製、厚さ:30  $\mu\text{m}$ )を用いた。フィルムへの微細加工形成はエキシマレーザーマイクロ加工装置(浜松ホトニクス社製L4500、発振媒質:KrF、波長:248 nm、照射エネルギー:3 J/cm<sup>2</sup>pulse、発振周波数:70 Hz)を用いて行った<sup>1)</sup>。レーザー光はマイクロ加工機内のビーム成形光学系にて均質化し、可動式試料ステージに固定したフィルムに照射した。ステージの移動、位置決め、およびレーザー発振はすべてコンピュータで制御した。加工状態はフィルムを顕微鏡により拡大してテレビモニターで *in situ* で観察した。多孔化したポリウレタンフィルムの片側表面に光反応性ゼラチン<sup>2)</sup>(ゼラチンのベンゾフェノン導入体)をヘパリンと混合して塗布し、紫外光照射により固定化した。フィルムの処理面が内腔に向くようにバルーン拡張型ステント(Johnson & Johnson-Cordis社製 Palmaz Stent, 寸法:長さ20 mm, 外径2.1 mm, Palmaz-Schatz Stent, 長さ15 mm, 外径1.5 mm)の外側に置き、顕微鏡下にて10.0 ナイロン糸にて支持縫合した後、フィルムの断端を重ね合わせジメチルアクリルアミドにて溶融接

田附興風会北野病院脳神経外科

\*国立循環器病センター研究所生体工学部

\*\*国立循環器病センター病院病理部

\*\*\*九州大学大学院医学系研究科

連絡者 (corresponding author): 松田武久 (Takehisa Matsuda)

九州大学大学院医学系研究科医工学分野 (〒812-8582 福岡県福岡市東区馬出3-1-1) Department of Biomedical Engineering, Graduate School of Medicine, Kyushu University, 3-1-1, Maidashi, Higashi-ku, Fukuoka 812-8582, Japan. E-mail: matsuda@med.kyushu-u.ac.jp

Received on Oct 16, 1999; Accepted on Dec 7, 1999

着させることによりカバードステントを作製した。

## 2. 動物実験, 組織観察

作製したカバードステントをバルーンカテーテル (Johnson & Johnson-Cordis 社製 Opta-5, バルーンサイズ: 4 mm 径, 2 cm 長, または Savvy, バルーンサイズ: 3 mm, 2 cm) にマウントした後に, 成犬 (体重: 13~15 kg, ビーグル犬) あるいは白色兔 (2.8~3.3 kg) の大腿動脈より透視下で総頸動脈に誘導し, バルーンを拡張させてカバードステントを血管内に留置した。一定期間後, 閉存性を血管造影にて評価した。またステントを血管を含めて摘出し, 10%ホルムアルデヒド緩衝液 (PH 7.2) にて固定した。固定組織をアルコール系列で脱水後, グリコールメタクリレートにて樹脂包埋し, 円周方向の薄切片を作製し, HE 染色あるいは Elastica VanGiesse 染色を行い, 組織学的に血流面への組織進入の程度を評価した。別に摘出組織を 1%オスミウム酸で後固定した後に, アルコール脱水, 白金パラジウム蒸着し, 走査型電子顕微鏡 (JSM-6301 F,

JEOL) にて内腔面および断面形状を観察した。

## III. 結果

カバードステントの作製方法を図 1 に示し, 概略を以下に示す。まず, カバーフィルムの基材となるセグメント化ポリウレタンフィルムにエキシマレーザー加工装置を用いて多孔構造化を行った。これに光反応性ゼラチンを用いて表面にゲルを固定し, ゲル内部にヘパリンを包埋させた。この表面処理した多孔質ポリウレタンフィルムを市販のバルーン拡張型ステントの外側に表面処理面が内側になるようにラッピングした。フィルムの片側断端をステントの支持金属に縫合固定した。反対側の断端を先の固定断端面に重ね合わせ, ジメチルホルムアミドにより溶融接着した。以下に, 各段階ごとについて説明する。

### 1. カバーフィルムの多孔化

ポリウレタンフィルムにエキシマレーザーの紫外パルス光を円形の貫通孔を有するフォトマスクを通して照射する

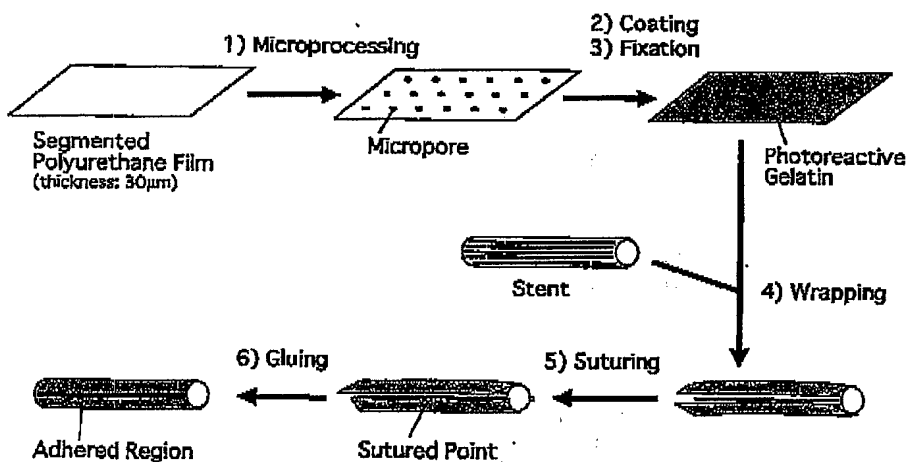


図 1 カバードステントの作製手順

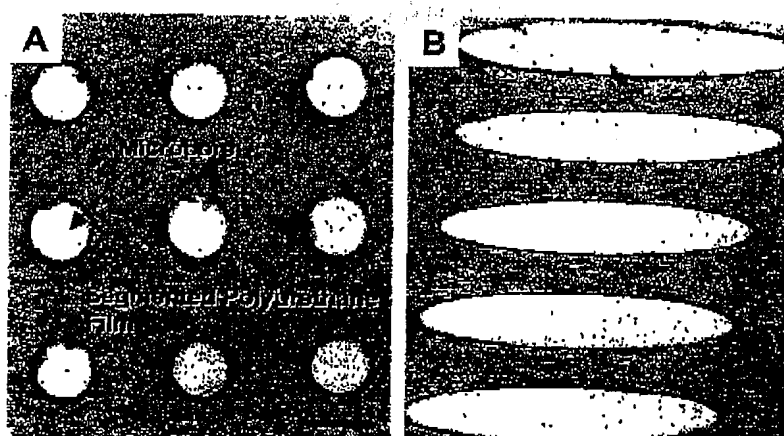


図 2 エキシマレーザー加工により作製し (A), 延伸により引き延ばされた (B) 多孔質ポリウレタンフィルム, Bar=100 μm.



と、フォトマスクの形状に一致した円形の貫通孔が形成された。コンピューター制御による自動移動ステージを用いて照射部位を段階的に移動させると孔の配置を任意に設計することができた (図2A)。

作製した多孔質フィルムの力学的性質を引っ張り強度試験により調べた。フィルムを一定速度で延伸させると、フィルムの歪みが増加し、孔形状は円形から楕円形に変化した (図2B)。

100%までの歪みの変化の範囲内では応力はほぼ直線的に増加し、また4倍程度まで延伸させても破断することはない (図3)。延伸初期に得られた歪み-応力曲線の直線部の傾きからフィルムの弾性率 (Young 率) を求めると、無孔フィルムの場合は  $1.6 \times 10^7$  Pa であり、直径  $100 \mu\text{m}$  の孔を  $500 \mu\text{m}$  間隔で多孔化したフィルムでは  $1.3 \times 10^7$  Pa、 $250 \mu\text{m}$  間隔では  $7.5 \times 10^6$  Pa であった。

## 2. フィルム表面へのヘパリンの固定化

これまでに光表面修飾剤として開発した光反応性ゼラチ

ン<sup>24)</sup>をヘパリンと混合して水溶液とし、ポリウレタンフィルム表面に塗布・乾燥させた後に、紫外光を照射した。水洗浄にて未反応の光反応性ゼラチンを除去した。処理したフィルムを水で激しく洗浄してもゼラチン層は剥げ落ちることなく強固にフィルム表面に固定されていた。

処理したフィルムの断面を走査型電子顕微鏡で観察すると、厚さ  $30 \mu\text{m}$  のフィルムを貫通する微細孔を塞ぐようにフィルム片面のみに厚さ約  $5 \mu\text{m}$  の極く薄いゼラチンゲルの薄膜の形成を認めた (図4)。

また、照射領域をフォトマスク (図5A) を用いて規制することにより、ヘパリンを含む光反応性ゼラチン水溶液を

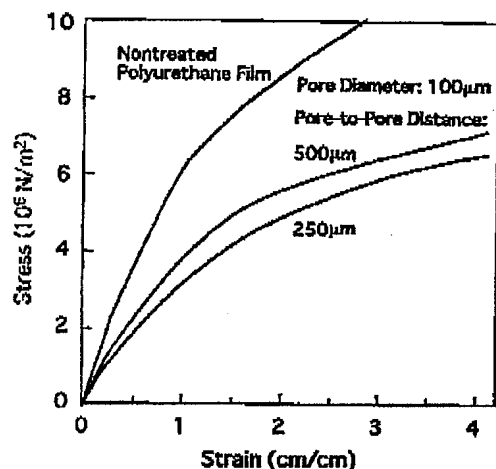


図3 多孔質ポリウレタンフィルムの延伸による歪み-応力の関係。

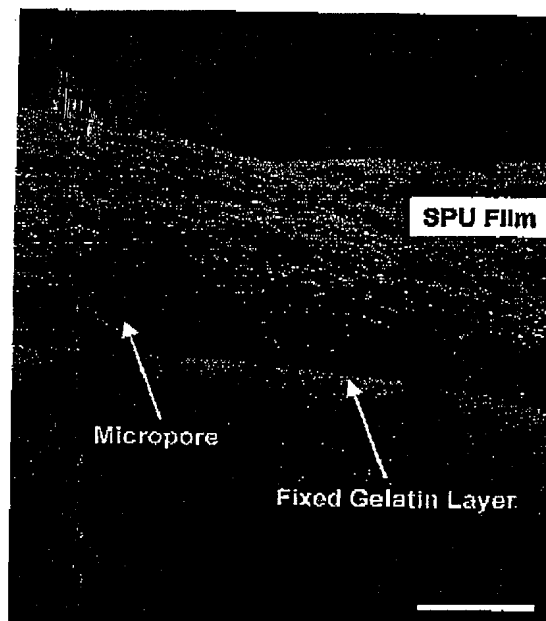


図4 光反応性ゼラチンゲルを表面に固定化した多孔質ポリウレタンフィルムの表面および断面形状の走査型電子顕微鏡写真、Bar=100  $\mu\text{m}$ 。

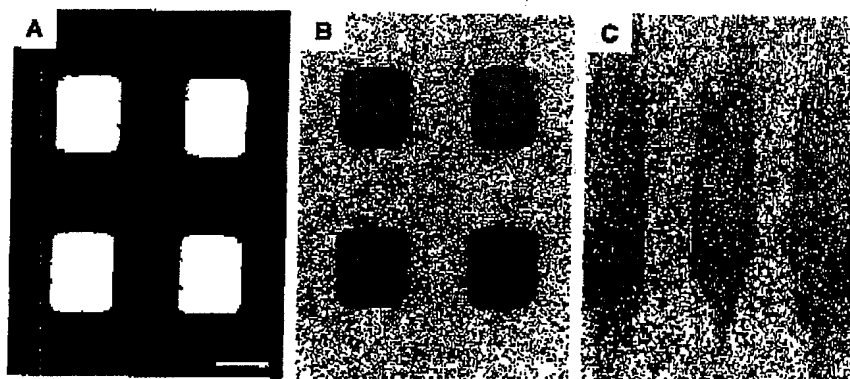


図5 ヘパリンを包埋したゼラチンゲル層を表面固定したポリウレタンフィルム。(A) 領域を規制して照射するために用いたフォトマスク。(B) フォトマスクを用いた照射によりヘパリンを包埋したゼラチンゲル層を表面の一部の領域に固定したポリウレタンフィルムをトルイジンブルー染色した表面。(C) 延伸させた (B) で作成したフィルム、Bar=500  $\mu\text{m}$ 。

塗布したポリウレタンフィルム表面の部分領域にのみ光照射を行った。照射したフィルムを水洗浄した後にトルイジンブルー水溶液に浸漬した。ここで、トルイジンブルーはカチオン性の青色素であり、これは分子内に多数の硫酸基を有するアニオン性の多糖であるヘパリンとイオン結合することが知られており、ヘパリンの検出試薬として用いられている。<sup>1)</sup>浸漬後、洗浄するとフィルム表面の照射領域のみが青紫色に染色された(図5B)。一方、ヘパリンを含まない光反応性ゼラチンのみを用いた場合にはほとんど色変化はなかった。

以上より、ヘパリンを含む光反応性ゼラチンに光照射するとヘパリンを包埋したゲルが生成し、同時にポリウレタンフィルム表面に固定化されたといえる。また、このゼラ

チン固定化フィルムを延伸すると、ゼラチン層は剥がれることなくフィルムの伸張に追従した(図5C)。

ヘパリン包埋の有無によるポリウレタンフィルム表面での抗血栓性を *in vitro* で比較した。上記と同様にヘパリンを包埋したゼラチン層を表面固定したフィルムを作製し、これを完全血中に浸漬した。37°Cで10分間放置した後に、フィルムを取りだし、生理食塩水にて洗浄した。未処理のポリウレタンフィルムの場合、フィルム一面に血栓が形成された(図6)。一方、ヘパリンを含むゼラチンを固定したフィルムの表面では血栓の形成は肉眼的には全く認めなかった。

### 3. カバーステントの作製

ポリウレタンフィルムの片側一面にヘパリンを包埋したゼラチン層を固定化し、ゼラチン固定面が内腔側に向くようにバルーン拡張型ステントの外側にフィルムを置いた(図7A)。次に、顕微鏡下にて10.0ナイロンにてフィルム断端の3カ所をステントの支持金属ワイヤー部に縫合固定した(図7B)。縫合部を起点に約半円周分のフィルムをステントに巻き、そこで更に2カ所縫合固定した。その後、残りのフィルムを完全に巻き(図7C)、支持固定した断端とフィルムの巻き残り部約1mm幅の自由端を重ね合わせてジメチルホルムアミドを塗布して溶融接着した(図7D)。

溶融接着したポリウレタンフィルムを先と同様に引っ張り強度試験機を用いて延伸させると、歪み増加に伴う応力の増加を示した(図8)。得られた歪み-応力曲線において、初期歪みにおける直線部の傾きをもとに見かけの弾性率を算出すると、溶融接着フィルムは未処理に比べ約2/3に減少していたが、約4倍に延伸しても接着面が破断すること

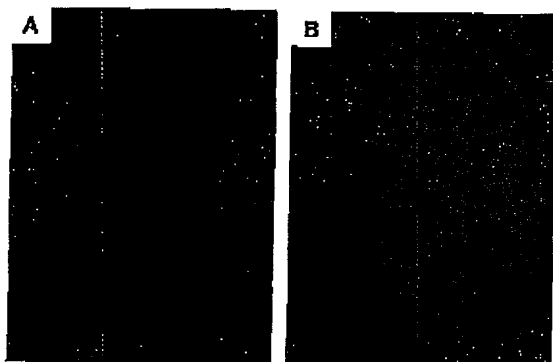


図6 完全血に浸漬させた未処理の多孔質ポリウレタンフィルム(A)、およびヘパリン包埋化ゼラチンで表面固定した多孔質ポリウレタンフィルム(B)。

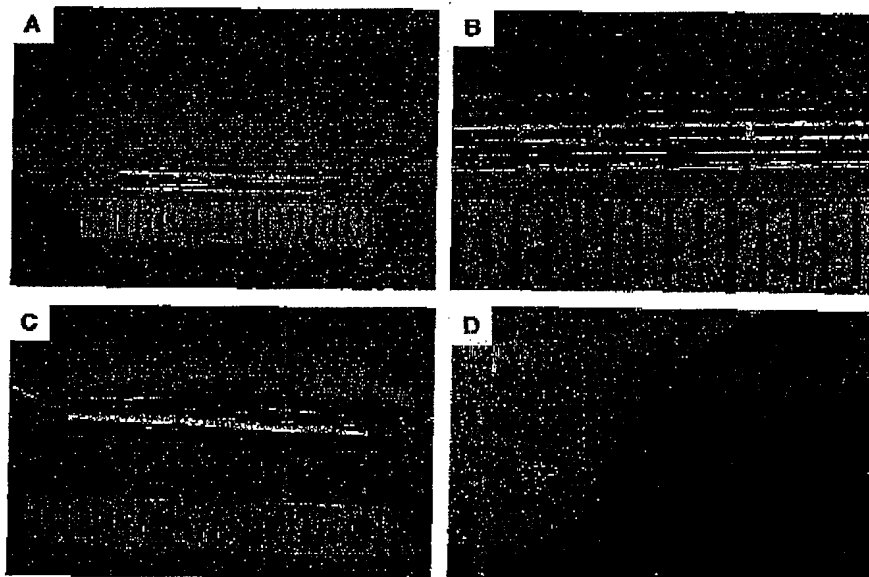


図7 (A)多孔質ポリウレタンフィルムとステント。(B)フィルム片側断端のステントの支持金属への縫合固定。(C)フィルムのステントへの被覆化。(D)フィルム両断端の重ね合わせ部へのジメチルホルムアミド塗布によるフィルムの溶融接着。

はなかった。

作製したカバードステントをバルーンカテーテルにマウントした(図9A)。バルーンを拡張させるとフィルム共々ステントが拡張した(外周拡張量約2.3倍, 図9B)。バルーンを収縮させステントから引き抜いても、ステントの拡張形状は変化することなく維持された(図9C)。

#### 4. 動物移植実験

径30  $\mu\text{m}$ の微細孔を125  $\mu\text{m}$ 間隔で配置した多孔質ポリウレタンフィルムを用いてカバードステントを作製し、

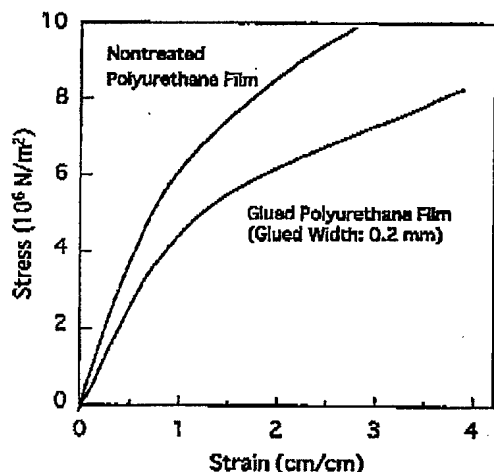


図8 ジメチルホルムアミドにより断端を接着したポリウレタンフィルムの延伸による歪み-応力の関係。

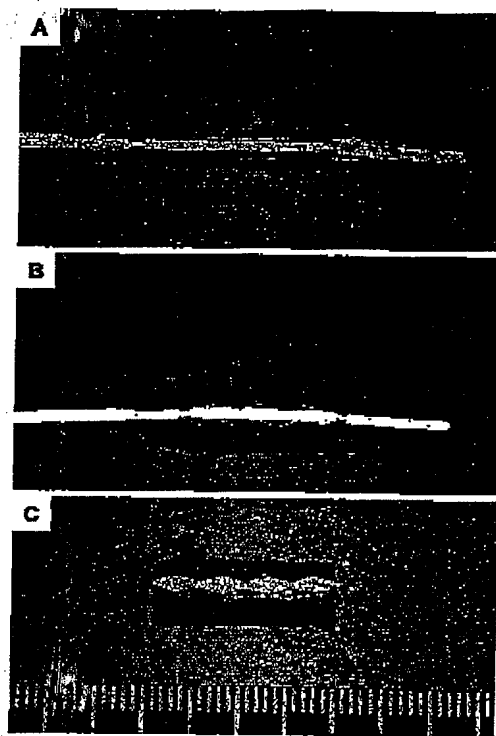


図9 (A) バルーンカテーテルにマウント後、(B) バルーン拡張による拡大後、(C) バルーンを引き抜いた後のカバードステント。

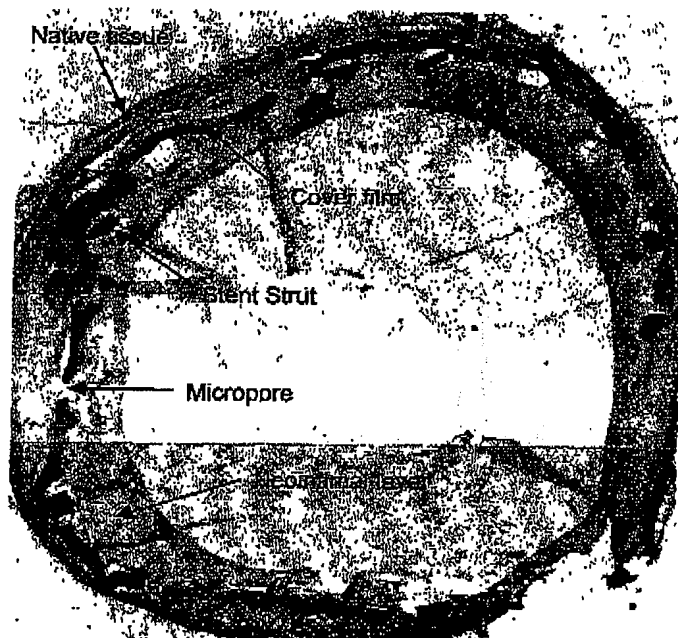


図10 表面処理を施していないカバードステントをウサギに植え込み3週後に開存していた総動脈の内周方向での組織断面の光学顕微鏡写真。

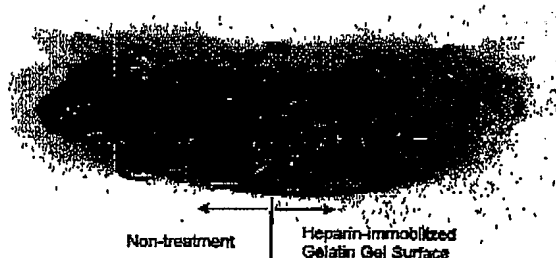


図 11 ステントの未梢側半分をヘパリン化ゼラチンで固定化したカバードステントを3日間ウサギの総頸動脈内に留置した後の内腔面。

成犬あるいは兎への植え込み実験を行った。カバードステントをバルーンカテーテルにマウントした後に、6Fあるいは5Fシースを留置した大腿動脈から挿入し、透視下にて総頸動脈に誘導し、バルーンを拡張(4mmないしは3mm径)し、当該血管にカバードステントを留置した。カバードステントをマウントしたバルーンカテーテルを直接、シースに挿入する際には、はずれないよう細心の注意を要した。血管内の操作においてはフィルムの有無で差はなくスムーズであった。

成犬10頸動脈(4mm径)においては、表面処理を施していない多孔質フィルムを用いても約1ヵ月後には開存していた。兎6頸動脈(3mm径)においては、2閉塞、2狭窄であった。

兎へ移植し、3週間後に開存していたステントについて、ステントを含む血管組織の円周方向での横断切片をElastic VanGiessen染色した後に、光学顕微鏡にて観察した(図10)。ステント内腔面は全周にわたって内膜組織層が形成された。走査型電子顕微鏡観察すると、内腔面はほぼ完全にコンフルエントな内皮細胞層で被覆されていた。また、断面観察においてフィルム微細孔を貫通する多数の組織侵入像を認めた。

一方、ヘパリン包埋化ゼラチン層をフィルム表面に部分的に固定し、兎頸動脈に移植した。3日後に摘出し、内腔面を観察すると、未処理のポリウレタンフィルム表面では顕著な血栓形成を示した(図11)。一方、ヘパリンを含むゼラチン層を固定化した表面では血栓形成は大幅に抑制された。

#### IV. 考 察

動脈硬化性の動脈狭窄病変に対して、従来のバルーンに加えステントなど外科的手術に比べless invasiveな血管形成が盛んに行われ、その治療効果は多大である。しかし、慢性期の再狭窄が問題となっている。この再狭窄の抑制を自的として従来型のステントに対して、ステント金属部を合成高分子で被覆化する、さらに高分子内へ薬物を混入する、またはヘパリンなど抗血液凝固物質で金属部を被覆化するなどの試みが行われている<sup>9)</sup>。

我々は今回従来のステントを改良し、組織侵入量の調節と抗血液凝固性の2つの機能を付与したカバードステントを作製した。組織侵入量の調節機能の付与はカバー材として用いたポリウレタンフィルムに精密な微細孔設計することにより行った。また、抗血液凝固機能に関しては、既に表面修飾剤として開発している光反応性ゼラチン<sup>10)</sup>を用いてヘパリンを包埋したゼラチンゲルをフィルム表面に固定化することにより付与した。

ポリウレタンフィルムへの微細孔設計はエキシマレーザーを用いて行った。エキシマレーザーは紫外域に高強度のエネルギーを有するパルスレーザーであり、分子間の結合を化学的に解離させることができ、ほとんど熱を伴わないため高分子の精密加工法として利用されている。我々は既にポリウレタンフィルムにエキシマレーザー照射するとミクロンレベルの精度で加工できることを示し<sup>7)</sup>、小口径人工血管の作製手段として利用している<sup>7)</sup>。今回カバー材として用いたシーダム製のポリウレタンフィルムにおいても精密に微細孔形成することができた(図2A)。多孔化することによりフィルムの弾性率は減少し(図3)、孔密度の増加によりさらに減少した。多孔化フィルムの弾性率は孔形成部を除くフィルム面の総面積に依存して減少することを既に報告しており<sup>8)</sup>、今回得られた傾向と一致した。

作製したカバードステント(ヘパリン未固定)をイヌおよびウサギに移植すると開存性に差が生じた。閉塞を来した主要原因として移植初期における血栓形成が考えられた。これは術前後の抗血小板剤の使用の有無、血流量の差、ステント自体の差などによるものと考えられた。開存例については新生内膜層の構築が促進された。微細孔からの経壁的組織侵入が起こったことによると考えられる。

続いて、カバーフィルム表面へ抗血液凝固性を付与する目的でヘパリン固定化を行った。これは、我々の研究グループに於いて既に合成され、組織接着剤や人工血管の表面修飾剤として応用している光反応性ゼラチンを用いて行った<sup>10)</sup>。これはコラーゲンの熱変性タンパク質であるゼラチンの側鎖に紫外光を照射することによりラジカルを発生するベンゾフェノン基を導入したものであり、ゼラチン1分子あたり約30個のベンゾフェノン基が導入されている。光反応性ゼラチンを用いると、基材表面にコーティングして照射するだけでゲルを形成すると同時に基材表面に強固に固定することができ、また、光反応性ゼラチンのコーティング時にヘパリンを混合しておくことで生成したゼラチンゲル内にヘパリンを包埋することができた(図4, 5)。

ゼラチンゲル内にヘパリンを包埋させると血液凝固が大幅に抑制された(図6, 11)。これはゼラチンゲルの表面に固定されたヘパリンおよびゲル内部より放出されたヘパリンによるものと考えられる。光反応性ゼラチンのコーティング時に他の薬物を混合しておけば、生成ゼラチン内に容易に包埋することが可能である。ゼラチン層は薬物の担持・放出機能を有するマトリックスとして機能することが

期待される。

ヘパリンは1970年後半に血管平滑筋細胞に対する増殖抑制効果が見いだされ、最近では、抑制効果の生化学的作用機序に関する基礎的研究が精力的に行われており、また臨床的にもヘパリンの動脈硬化部位での局所投与による抗内膜肥厚化が検討されつつある。したがって、ステント内面のゼラチン層から徐放されるヘパリンは抗凝固効果、外面の組織接触面からは平滑筋細胞の増殖抑制効果が期待できる。また、ゼラチン層の光形成・固定化技術は、本研究でのヘパリンによる抗凝固作用に加えて、より積極的な薬物治療が原理的に可能である。すなわち、内面と外面のゼラチン層に異なる薬剤を担持させる drug delivery system をステントに搭載することによって積極的な血管再構築を行うものである。例えば、強力に平滑筋細胞の増殖を特異的に抑制する薬剤や遺伝子を組織接触面に包埋・固定化して内膜肥厚を抑制し、一方、血液接触面には、ヘパリンに加えて、内皮細胞のみに作用する増殖因子(例えば, Vascular Endothelial Growth Factor, Hepatocyte Growth Factor)を固定化して血液接触面の早期内皮化が期待できると考えている。また、フィルムに作製した多数の微細孔を経由してフィルム外側の生体血管組織から内腔面への組織侵入が起こり、新生内膜層が早期に構築されれば長期にわたり血栓形成が抑制できるものと考えられる。さらに慢性期において内腔への組織侵入量が微細孔の密度の調節で制御できれば内膜肥厚が抑制され、再狭窄の防止につながるものと期待される。現在、ヘパリン包埋化ゼラチン層を全面に固定化した多孔質フィルムを用いてカバードステントを作製し、兔頸動脈への移植を行っている。将来的には動脈硬化性再狭窄モデルへの応用を考えたい。

## V. 結 語

エキシマレーザー加工機による微細孔設計と光反応性ゼラチンを用いた表面修飾設計の最適化によりステント植え込み早期における内皮化を含む血管壁再構築の促進化と慢性期における内膜肥厚の抑制を両立させる高機能カバードステントの作製が可能と考えられた。

本研究の一部は医薬品副作用被害救済・研究振興調査機構の「保健医療分野における基礎的研究推進事業」(No. 97-15) によるものである。

## 文 献

- 1) Nakayama Y, Matsuda T: Surface microarchitectural design in biomedical applications: Preparation of microporous polymer surfaces by an excimer laser ablation technique. *J Biomed Mater Res* 29: 1295-1301, 1995
- 2) Matsuda T, Nakayama Y: Surface microarchitectural design in biomedical applications: In vitro transmural endothelialization on microporous segmented polyurethane films fabricated using an excimer laser. *J Biomed Mater Res* 31: 235-242, 1996
- 3) 中山泰秀, 坂口泰久, 増田慎介, 岡野高久, 松田武久: ゼラチン-ポリエチレングリコール混合系光硬化型医療用軟組織接着剤の設計: 血管外科領域への応用. *人工臓器* 26: 225-231, 1997
- 4) Nakayama Y, Matsuda T: Photocurable surgical tissue adhesive glues composed of photoreactive gelatin and poly (ethylene glycol) diacrylate. *J Biomed Mater Res Appl Biomater* 48: 511-521, 1999
- 5) Smith PK, Mallia AK, Mermanson GT: Colorimetric method for the assay of heparin content in immobilized heparin preparations. *Anal Biochem* 109: 466-473, 1980
- 6) Ozaki Y, Violaris A G, Serruys P W: New Stent Technologies. *Prog Cardiovasc Dis* 39: 129-140, 1996
- 7) Doi K, Nakayama Y, Matsuda T: Novel compliant and tissue-permeable microporous polyurethane vascular prosthesis fabricated using an excimer laser ablation technique. *J Biomed Mater Res* 31: 27-33, 1996
- 8) 中山泰秀, 松田武久: 人工臓器・組織工学の力学的人工骨格設計: 弾性フィルムのエキシマレーザー加工による多孔構造化と力学的物性. *人工臓器* 28: 237-241, 1999